

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Junji HAMURO, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: TRANSPLANT REJECTION SUPPRESSOR

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International PCT Application No. PCT/JP01/11054, filed December 17, 2001, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:


<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2000-394755	December 26, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
☐ are submitted herewith
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon

Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Thomas W. Barnes, III
Registration No. 52,595

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月26日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-394755

[ST.10/C]:

[JP2000-394755]

出 願 人

Applicant(s):

味の素株式会社

2003年 6月 3日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3042920

【書類名】 特許願

【整理番号】 P6908AJ

【提出日】 平成12年12月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
中央研究所内

【氏名】 羽室 淳爾

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社
中央研究所内

【氏名】 村田 幸恵

【発明者】

【住所又は居所】 京都府乙訓郡大山崎町円明寺薬師前 1 番地

【氏名】 山田 潤

【発明者】

【住所又は居所】 京都市中京区絹屋町 1 3 6 ヴェルドール御所 2 0 2

【氏名】 佐野 洋一郎

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市阿倍野区北畠 1 - 3 - 1 1

【氏名】 木下 茂

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080229

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 康昌

【電話番号】 045-476-1131
【選任した代理人】
【識別番号】 100080816
【弁理士】
【氏名又は名称】 加藤 朝道
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 059042
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9803677
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 移植拒絶反応抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マクロファージ、単球及び樹状細胞の何れかの細胞内の還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質を有効成分として含有することを特徴とする移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 2】

当該還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質が、マクロファージと 1 ～ 2 4 時間試験管中で培養したときに、当該マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン含量を少なくとも 3 0 % 低下させる化合物の 1 種以上である請求項 1 に記載の移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 3】

マクロファージ、単球及び樹状細胞の何れかの細胞内の還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質が、N,N'- ジアシルシスチン、同エステル体、ブサルファン (BCNU)、L-S,R-ブチオニンスルホキシミン (BSO)、同誘導体、マレイン酸ジエステル等の低分子化合物の少なくとも 1 種である請求項 1 又は 2 に記載の移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 4】

臓器移植拒絶反応抑制剤である請求項 1 又は 2 に記載の移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 5】

当該臓器が、肝臓、肺臓、腎臓、肝臓、心臓、皮膚、角膜、角膜上皮等の何れかである請求項 4 に記載の移植拒絶反応抑制剤。

移植される臓器はその一部でもよい。

【請求項 6】

拒絶反応が、マイナー抗原に対する拒絶反応を主たるものとする請求項 1 に記載の移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 7】

当該臓器が、角膜、角膜上皮細胞等であり、拒絶反応がマイナー抗原に対する

拒絶反応を主たるものとする請求項 4 又は 5 に記載の移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 8】

医薬品の形態にある請求項 1 ～ 7 何れかに記載の移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 9】

医薬品が、経口用薬剤、点眼薬、及び輸液製剤の何れかの形態にある請求項 8 に記載の移植拒絶反応抑制剤。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 7 何れかに記載の移植拒絶反応抑制剤を含むことを特徴とする飲食品又は栄養剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、マクロファージ（以下、「Mφ」と記すことがある。）、単球や樹状細胞の機能の斬新な制御方法に関し、特に、ヒトの臓器移植に随伴する急性、慢性の拒絶反応を抑制することを目的とした経口摂取できる移植拒絶反応抑制剤及びそれを利用した医薬品（経口用薬剤、点眼薬、輸液等）並びにその活性作用を有する飲食品、栄養剤等に関する。

【0002】

【従来の技術】

免疫系は、ウイルス、細菌等の外部からの感染、又は自己由来細胞が異常を来たすことで生成する細胞（癌細胞等）による生体侵襲から自己を防衛するためのシステムである。しかしながら、この免疫系が異常を来たし、過剰に働いたり、自己成分を排除する方向に免疫系が働いたりすると共に、逆に、排除機能が不全状態に陥ることがある。このような状態を惹起する疾患は総称して免疫性疾患と呼ばれる。例えば、アトピー性皮膚炎、花粉症、喘息、ザルコイドーシス等の急性並びに慢性炎症性疾患、アレルギー性疾患、慢性関節リウマチ、糖尿病（IDDM）、SLE、慢性疲労性症候群等の自己免疫疾患や、肝炎、肝硬変、潰瘍性大腸炎、クローン病等消化管炎症（IBD）、癌悪液質状態等、数多くの疾患が含まれる。これら免疫性疾患の原因は様々であるが、サイトカインや、炎症性メディエ

ーターの局所での産生を介して、特定の細胞の増殖、分化、壊死を伴う炎症を引き起こすことを発端として全身性の免疫不全、機能不全状態に到る。一方、腎臓、肝臓、心臓、肺臓、皮膚、角膜等種々の臓器移植反応に際しては生体の有する免疫応答反応により移植片が拒絶され、脱落することがよく知られている。

【0003】

免疫を担当する細胞としてはTリンパ球、Bリンパ球がよく知られ、各々細胞性免疫、液性免疫の担い手として多彩な機能を発揮する。一方、マクロファージ／単球（樹状細胞、ランゲルハンス細胞を含む。）は細胞性免疫及び液性免疫に深く関与する細胞で、アレルギー、リウマチ等の免疫性疾患、癌、細菌感染、移植組織等の非自己である異物排除に深く関わっている。マクロファージ／単球の機能は、分泌機能、抗原呈示を中心とした免疫調節機能、異物、老廃物の処理、貪食機能、標的細胞の障害処理機能の4種に大別され、TNF、IL-12、IL-1、IL-6、 $TGF\beta$ 、IL-8、IL-18等のサイトカイン、ネオプテリン（NPT）、ジハイドロキシエピアンドロステン（DHEA）等のホルモン様分子、 $PG E_2$ や $LT B_4$ 等のアラキドン酸代謝産物、 $C5a$ 、 $C3$ 等の補体系分子、活性酸素、活性窒素等、炎症像を規定する種々の分子を産生することが知られている。これらの多彩な機能が単一のマクロファージ／単球によって担われているのか、機能を異にするマクロファージ／単球集団によって担われているのかは不明であり、リンパ球がその細胞表面マーカーによって分類され、その機能との対応が明確になっているのに対し、マクロファージ／単球の機能の多様性と細胞亜集団の対応については全く不明である。このため、上述のような炎症性、アレルギー性、免疫性疾患の発症や臓器移植後の拒絶反応の病態進展に、マクロファージ／単球は極めて重要な役割を有しているにも拘らず、マクロファージ／単球細胞亜集団の存在を想定しての機能分類によるヒトの疾患の治療、改善、予防や、特に移植分野への応用は全くなされておらず、想定されたことすらなかった。

【0004】

近年、末梢血中のヘルパーT細胞亜集団のタイプの片寄りが疾患と対応づけられつつあり、Tリンパ球中の亜集団であるヘルパーTリンパ球が更に二つの亜集団Th1とTh2に分類され、その2種の存在比が生体の免疫機能の重要な指標になる

ことが立証されつつある。本指標を基に疾患の病態を診断したり、その存在比を改善することにより、より適切な治療法を樹立しようとの試みがなされつつある。即ち、B細胞からのIgE産生を引き起こすTh2がTh1より多い場合（ $Th1 < Th2$ ）、アレルギー性疾患が悪化することが分かってきており、Th1/Th2を測定することにより、免疫の状態を検定したり、 $Th1 > Th2$ にすることによりアレルギーを抑制しようとする試みがなされつつある。逆に、Th1が支配的な状況で引き起こされる疾患、生体反応の存在も慢性関節リウマチや移植拒絶反応を始め、次々に指摘されつつある。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】

生物材料を用いてTh1とTh2のバランスを測定し、Tリンパ球を標的にこの2つの亜集団の機能を調節しようとしても、局所慢性炎症やアレルギー性疾患の検定、診断に利用することには、現在のところ、成功していない。最近、Th1病やTh2病という用語も用いられるが、必ずしも二者に明確に区別できないのが実態である。

【0006】

Th1/Th2の存在比は、リンパ球亜集団の指標でしかなく、リンパ球亜集団の生体内での動態は本発明で取り扱うマクロファージ、単球を初めとするアクセソリー細胞と呼ばれる樹状細胞やランゲルハンス細胞等の細胞群の機能と実際には複雑に関わっているため、Th1/Th2の存在比だけで疾患の病態を適切に診断し、その情報を基に治療することは困難である。後述するが、マクロファージ/単球の機能状態によってTh1/Th2のバランスは制御されているのである。治療のために $Th1 > Th2$ に傾斜させることを意図しても、それだけでは複雑なサイトカインネットワークにおいては効果が得難く、新たな診断、治療のための指標が待ち望まれている。

【0007】

炎症反応、拒絶反応に深く関与しているマクロファージにおいて、酸化ストレス、サイトカイン刺激、ウイルス、細菌感染等の環境因子により細胞の機能が変化することが判明しているが、その機能とマクロファージの細胞亜集団分類の対

応については全く不明である。それら機能、分類において新たな知見が必要であり、それらの知見が得られることにより、飛躍的に有用な新たな治療方法の開発に繋がる。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、前記課題解決に向けて鋭意検討した結果、次のような各種の知見を得た。即ち、組織傷害作用の強いマクロファージ／単球／樹状細胞と、組織修復に関わるマクロファージ／単球／樹状細胞との区別を、マクロファージ／単球／樹状細胞のレドックス状態の相違から試み、それを可能とした。その指標としてはマクロファージ／単球／樹状細胞内の還元型グルタチオン（GSH）含量を採用する。

【0009】

グルタチオンは、ほ乳類のあらゆる細胞に存在し、内因性の抗酸化物質としてよく知られ、細胞内においてラジカルや過酸化物の除去、プロスタグランジン等のエイコサノイドの代謝、生体異物の解毒、アミノ酸輸送等多様な機能を有しているトリペプチドである。還元型（GSH）と酸化型（GSSG）が存在し、両者間で共役サイクルを形成する。通常の細胞では、GSHの濃度は還元状態の方が圧倒的に多く、酸化ストレス、特に H_2O_2 に対して防御的に作用する。

【0010】

既に、Rude等は、GM-CSFにより分化したマクロファージと、M-CSFにより分化したマクロファージでは、細胞内GSH濃度は前者の方が高濃度であることから、細胞内GSH濃度の相違がマクロファージの機能に関与している可能性を報告（Germann, T., Mattner, F., Partenheimer, A., et al.: Different accessory function for TH1 cells of bone marrow derived macrophages cultured in granulocyte macrophage colony stimulating factor or macrophage colony stimulating factor. Int. Immunol., 4:755, 1992; Frosch, S., Bonifas, U., Eck, H.-P., et al.: The efficient bovine insulin presentation capacity of bone marrow-derived macrophages activated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor correlates with a high level of intracellular

reducing thiols. Eur. J. Immunol., 23: 430, 1993) しているが、本発明者等は、マクロファージ／単球中の還元型GSH含量を測定すると共に、GSH含量を異にするマクロファージの免疫機能に及ぼす効果に大きな差のあることや、この測定法で生体の免疫能を検定しその酸化還元状態を経口投与可能な特定の低分子化合物で人為的に調整できることを見出し、更に本法を臓器移植に随伴する急性並びに慢性の拒絶反応の抑制という治療行為に活用することができ、また、特にそのために使用する物質（前記特定の低分子化合物）を特定の薬剤、例えば医薬品として広範に応用できること並びにそのような活性を示すものとして飲食品や栄養剤中に含めて使用できることを見出した。

【 0 0 1 1 】

本発明者等は、更に上記知見に基づき、更に研究を重ねた結果、炎症反応に重要な役割を果たしているマクロファージ細胞中の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの含量を検定することにより、不均一なマクロファージ集団が二つのタイプ、即ち酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類することができ、還元型マクロファージが免疫疾患に伴う局所組織炎症や臓器拒絶反応反応を引き起こし、液性免疫と細胞性免疫のバランスに関与するTh1/Th2バランスはマクロファージの酸化還元状態によって制御されていること、当該マクロファージの酸化還元状態が臓器拒絶反応の病態に重要な役割を果たしており、当該酸化還元状態を検定し、その状態を人為的に制御、修飾することにより、当該病態の診断及び、治療に役立つこと、しかもその制御が、前記の如く経口摂取可能な低分子化合物によって簡便に行えることを見出した。

【 0 0 1 2 】

現在、Th1/Th2バランスはIL-6、IL-10若しくはIL-4とIL-12が生体内でどのような割合で産生されるかによって規定されと考えられている。前3者によって液性免疫に関与するTh2が、IL-12によって細胞性免疫に関与するTh1が誘導されることが既に知られている。しかしながら、IL-6、IL-10及びIL-12はマクロファージから産生されることは判明しているが、同一のマクロファージ細胞がIL-6、IL-10及びIL-12の全てを産生するとすると、Th1誘導にもTh2誘導にも関与する1種のマクロファージが存在することとなり、生体の免疫応答を考えるに当り大き

な矛盾にぶつかる。本発明者等はGSH含量の高い還元型マクロファージによってのみIL-12が産生され、Th1偏位が起こり、酸化型マクロファージによってはIL-6及びIL-10の産生が亢進し、Th2偏位が誘導されることを見出した。また、Th1サイトカインの代表であるIFN γ が産生されてもマクロファージが酸化型に傾斜していると、IFN γ の作用でTh2を誘導するIL-6が大量に産生されることも見出された。

【 0 0 1 3 】

逆に、還元型マクロファージが存在するとTh1サイトカインの代表であるIFN γ によってマクロファージの還元型形質が一層増強されることも判明した。酸化型マクロファージが誘導されているところにTh2サイトカインの代表であるIL-4が作用すると酸化型マクロファージの形質が益々増強される。これらの知見は液性免疫と細胞性免疫という対局にある免疫応答がマクロファージの酸化還元状態によって一義的に規定されていることを示すもので、免疫学の根幹に関わる重要な知見である。この知見を臓器移植拒絶反応の抑制に応用し、拒絶反応抑制という临床上頗る重要な治療法について、従来の混沌とした抗原非特異的免疫抑制法に代わる有用で独創的な発明を完成するに到ったものである。

【 0 0 1 4 】

本発明は、このように以上の多くの各種知見に基づいて完成されるに到った。

【 0 0 1 5 】

即ち、本発明は次の通りである。

マクロファージ内、単球細胞内、樹状細胞内何れかの還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質を有効成分として含有することに特徴を有する移植拒絶反応抑制剤、特に好ましくは臓器移植拒絶反応抑制剤に存する。

【 0 0 1 6 】

当該還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質は、マクロファージと1～24時間試験管中で培養したときに、マクロファージ、単球及び樹状細胞の何れかの細胞内の還元型グルタチオン含量を少なくとも30%程度低下又は減少させる化合物を1種又は2種以上使用することができる。

【 0 0 1 7 】

このようなマクロファージ、単球細胞、及び樹状細胞の何れかの細胞内の還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質として好ましくは、N,N'-ジアシルシスチン（ジアセチル体等）や、同エステル体（例えば、モノエチルエステル、ジメチルエステル、ジイソプロピルエステル等）等のシスチン誘導体、ブサルファン（BCNU）、L-S,R-ブチオニンスルホキシミン（BSO）、同誘導体、マレイン酸ジエステル（ジメチルエステル、ジエチルエステル等）等の低分子化合物を挙げることができる。これらの低分子化合物は有効成分として1種又は複数の混合物を使用することができる。

【 0 0 1 8 】

本発明において移植される臓器の代表例として、肝臓、肺臓、腎臓、心臓、皮膚、角膜、角膜上皮等を挙げることができる。移植される臓器の範囲については、臓器全体の移植及びその一部の移植を含む。

【 0 0 1 9 】

また、それら組織の幹細胞移植に対する拒絶反応に対しても適用することができる。

【 0 0 2 0 】

拒絶反応の代表例として、マイナー抗原に対する拒絶反応及びその反応主として含むものを挙げることができる。

【 0 0 2 1 】

特に好ましい移植される臓器としては、角膜、角膜上皮細胞等を挙げることができる。そのマイナー抗原に対する拒絶反応用に本発明の有効成分を好ましいものとして使用することができる。

【 0 0 2 2 】

本発明の移植拒絶反応抑制剤は医薬品の形態で使用するすることができる。その場合、経口用薬剤や非経口用薬剤（点眼薬、輸液製剤等）の何れかの形態で使用するすることができる。

【 0 0 2 3 】

点眼薬は角膜移植における拒絶反応の抑制に特に有効である。

【 0 0 2 4 】

本発明の戦記移植拒絶反応抑制剤は飲食品又は栄養剤中に含めて使用することもできる。

【 0 0 2 5 】

より具体的な形態として、本発明においてはヒトから分離、採取した体液／細胞試料を用いて、マクロファージ細胞内の酸化型及び／又は還元型グルタチオン量（グルタチオン含量）を検定することにより、マクロファージをそれぞれ異なった機能を有する酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類し（特開平11-246435号公報参照。）、その存在割合を前記のような低分子化合物で酸化型マクロファージに人為的に偏位させたり、還元型マクロファージを人為的に除去することで、ヒトの臓器移植拒絶反応の抑制治療に有用な医薬品（輸液を含む。）に使用可能な移植拒絶反応抑制剤や拒絶反応抑制に役に立つ飲食品、栄養剤等を提供することができる。ヒトから分離、採取した体液／細胞試料とは、例えば末梢血や腹腔、胸腔、局所組織、関節腔、各種臓器より分離した細胞である。

【 0 0 2 6 】

以下に、臓器移植拒絶反応抑制における本発明の移植拒絶反応抑制剤が、従来に無い極めて優れた薬剤であることについて説明する。

【 0 0 2 7 】

上述の様々な免疫性疾患と異なり、特に臓器移植においては移植術を行う時点がドナー抗原に対する最初の暴露であり、免疫学的操作が簡単に行える。臓器移植を行う場合には、拒絶反応抑制のために、免疫抑制剤を使用しているのが臨床における現状であるが、この治療では抗原非特異的に全ての免疫系が抑制されることや、易感染性等の副作用の問題がある。従って、ドナー抗原に対する免疫反応のみを選択的に抑制する方法の確立が重要であり、最も理想的な治療である。本発明者等は、ドナー抗原に対する免疫寛容の誘導を目的とし、自己移植と同様の恒久的な生着が得られ、免疫抑制剤を必要としない治療方法の開発を鋭意検討しここに本発明を完成した。この方法の開発は、21世紀の治療と呼ぶに相応しいと確信する。本発明を使用した治療のメリットは、移植臓器抗原に対する反応のみを抑制し（抗原特異性）、この細胞が出現した後には、抗原に暴露される程抑制

機構も強くなり(ドナー抗原に対するTh2細胞の誘導)、腎臓、肺臓、心臓、肝臓等の臓器移植のみならず、抗原提示が敏速に行われ拒絶反応の非常に生じ易いハイリスク眼への角膜移植においても応用可能なことである。

【 0 0 2 8 】

本発明者等は新しい拒絶反応抑制法の開発に取り組み、マクロファージのレドックス状態を人為的に制御することでTヘルパー2型(Th2)反応への偏位を惹起させ、このことにより抗原特異的な臓器移植拒絶反応を抑制する治療法を完成した。現在までにマウス角膜移植モデル、皮膚移植モデルにおいて抗原特異的なTh2CD4+T細胞を誘導することや、拒絶反応を効率的に抑制することに成功した。その方法は、臓器移植を施行すると同時に、Th2偏位反応を局所に誘導し、ドナー移植抗原に対する反応をTh1型からTh2型にシフトさせることにある。臓器移植の拒絶反応はTh1型CD4+T細胞が誘導する遅延型過敏反応によって主に生じるため、これに拮抗するTh2型T細胞を誘導することによって拒絶反応を選択的に抑制できたものである。

【 0 0 2 9 】

現在までのTh2偏位によるドナー抗原特異的拒絶反応抑制に関しては、IL-4やIL-10を大量投与したり、遺伝子導入したりする試みが多々なされているが、実際に抗原提示される場である局所リンパ節での反応に影響し難い。何故なら、サイトカイン自体は体内においてエンドクリン作用は持たず、細胞同士の近傍においてのパラクリン若しくはオートクリン作用が主だからである。しかも、長期継続投与には大量の費用と労力が必要である。本発明は、移植臓器を移植されたレシピエントが局所リンパ節でTh2サイトカインを放出する方法であり、全身性の副作用が少ない。更に、ドナーに対する反応が拒絶反応を抑制する反応に偏位するため、拒絶反応を常に上回る抑制が生じる。現在のところ、臓器移植においてこの方法を確立しているのは本発明者等のみである。この方法の最大のメリットは、生体内の免疫バランスを壊すことなく、また、生体内に存在する反応を利用して行うことができるため、安価、簡便、かつ安全に実現できることも特徴的である。

【 0 0 3 0 】

特に、角膜移植は他の臓器移植と比較して生着率が高く、安全な移植であり、アメリカで年間50,000件、日本で年間2,000件の手術が行われているのが現状である。更に、近年、角膜上皮細胞幹細胞（Stem cell）の存在部位が明らかになり、細胞生物学的な立場から新しい術式が確立され、これまで適応とならなかった疾患群に対して外科的治療を行うことが可能となった。こうした中で、現在最大の問題となっているのは移植片に対する拒絶反応であり、これらに対する臨床的な対応として大量のステロイドやサイクロスポリンの局所及び全身投与が行われているに過ぎず、これらの副作用が問題となっている。

【 0 0 3 1 】

また、適応疾患の拡大としてハイリスク眼への移植技術の確立が大きな課題とされる。新生血管が侵入している角膜への移植は抗原感作が早くなされ、また、エフェクター細胞（effector cell）がドナー角膜へ到達し易い。炎症後にランゲルハンス細胞が遊走している角膜への移植は抗原感作が早期に行われる。

【 0 0 3 2 】

更に、術式の拡大における課題として、角膜輪部移植や上皮移植がある。角膜輪部移植はドナーのランゲルハンス細胞を持ち込むため、抗原提示され易い。また、輪部移植、上皮移植共に、移植部位が角膜輪部であり、血管組織が豊富であるため、拒絶され易い。また、角膜上皮は抗原性が高い。従来用いられている抗原非特異的免疫抑制法には、全身的副作用の問題として易感染性、糖尿病、消化管潰瘍、神経症状、肥満、腎機能不全が、局所的副作用の問題としてステロイド緑内障、ステロイド白内障、易感染性等が指摘されており本課題も本発明を実施することで解決される。

【 0 0 3 3 】

レシピエントの角膜に新生血管の存在するハイリスク眼は移植拒絶反応が生じやすく、ステロイドや免疫抑制剤が用いられるが、未だ問題点が多い。角膜移植拒絶における報告では、MHC（主要組織適合性抗原）適合は拒絶反応の低下には効果なく、MHC以外のマイナー（minor）抗原の適合が拒絶反応を有意に減少させることが知られている。これは角膜がImmune privilege siteと呼ばれる免疫的に特殊な環境を有するためであり、(1)角膜組織においてはMHCの発現が低いこと

、(2)血管やリンパ管が存在しないこと、(3)角膜組織には抗原提示細胞が存在しないこと等が関与している。これらの特殊環境により、角膜移植におけるドナー抗原は、主にレシピエントの抗原提示細胞によって、レシピエントのT細胞に抗原提示されると考えられる(Indirect pathway of allorecognition)。この機序でレシピエントは感作され、抗原提示を受けたCD4+ T細胞がドナー抗原に対する遅延型過敏反応(DTH)を生じて拒絶反応を惹起する。角膜移植においては、角膜がimmune privilege siteであるという点で、これらの操作をより簡単に行っていると考えられる。

【 0 0 3 4 】

角膜移植は臓器移植の中で最も生着率のよい安全な移植であり、従来から世界で多数行われてきた。しかし近年、移植に対するコンセプトが発達し、移植術を施行する適応症や移植方法が拡大したため、拒絶反応の生じ易い角膜移植が増加している。

【 0 0 3 5 】

本発明の意義について角膜移植を例に述べる。強いTh2反応の誘導と、適切な時期における抗原の再暴露を組み合わせることにより、(1)角膜移植抗原に対する反応のみを抑制できる(抗原特異性)、(2)ドナー抗原に対してTh2に反応する細胞が誘導されているため、拒絶反応を常に上回る抑制反応を生じさせることができる、(3)抗原提示が敏速で拒絶反応を高率に生じるハイリスク眼においても応用可能である等である。

【 0 0 3 6 】

臓器移植においては、臓器の機能的な役割を保つことも考慮に入れなければならない。角膜移植は、移植片の形状や機能がシンプルであり、また、ドナーの抗原提示細胞が存在しないため、マイナー抗原に対する拒絶反応のモデルとして最も適した移植である。従って、角膜移植で樹立した拒絶抑制方法は他の臓器移植に十分応用可能であり、将来的に臓器移植の拒絶反応の抑制に対しても画期的な転機をもたらすものと期待される。本発明において得られる優れた効果、特にその代表例である角膜移植拒絶反応抑制と移植片定着に関わる新規な点として、(1) 抗原提示細胞を操作し、免疫反応を変化させるというこれまで全く見られな

かった治療法における有効な効果であること、(2) 従来からの方法としては抗原非特異的な免疫抑制以外になかった点を打破した、(3) 研究レベルでは抗体等によるトレランスの誘導が用いられていたが、実用にならない点を打破した点が挙げられる。また、より優れた点としては(1) 従来の非特異的な免疫抑制法から抗原特異的な免疫抑制が行える可能性があること、(2) 免疫抑制剤の使用を制限できる点が挙げられ、実用上有利な点としては、(1) 抗原特異的に抑制できる点、(2) 安価で達成できる点、(3) 本発明になる治療の後には抗原に暴露される程抑制機構も強くなる点(ドナー抗原に対するTh2細胞の誘導)、(4) 抗原提示が敏速に行われ拒絶反応を生じ易いハイリスク眼においても応用可能な点、等が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

前記グルタチオンの測定方法としては、直接的に酵素リサイクリング法で生化学的に酸化型又は還元型グルタチオン含量を測定する(活性酸素実験プロトコール(細胞工学別冊)、秀潤社、頁84-88、1994年、ANALYTICAL CHEMISTRY, VOL.106, PP207-212, 1980, CELLULAR IMMUNOLOGY, VOL.164, PP73-80, 1995参照。)のみならず、間接的な測定、例えば酸化型又は還元型マクロファージに対する特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いて測定したり、モノクロロバイメインのようにGSHに特異的に反応し、錯体を形成し、レーザー光励起により蛍光を発するような試薬を用いればよい。

【 0 0 3 8 】

【発明の実施の形態】

本発明の実施の形態について説明する。

本発明におけるグルタチオンとは、別名5-L-グルタミル-L-システイニルグリシンであり、生体内に最も多く存在するSH化合物で、一般にGSHと記述される。グルタチオンには、その分子の酸化状態により還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンに分類される。還元型グルタチオンとは、前記のグルタチオン(GSH)のことであり、酸化型グルタチオンは、別名グルタチオンジスルフィドと呼ばれるもので、GSSGと記述される。

【 0 0 3 9 】

本発明におけるマクロファージの分類方法とは、前記、酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンとの量の検定に基づく方法である。マクロファージは、様々なサイトカインや炎症性メディエーター等の情報伝達物質をその細胞から遊離、放出することが知られているが、その活性化状態、分化状態により、放出されるか否か、また放出される量が異なること、従ってその機能が異なってくることを本発明で始めて見出したものである。本発明の分類方法では、マクロファージ細胞内の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンとの含量に着目し、酸化型マクロファージと還元型マクロファージに分類した。

【 0 0 4 0 】

還元型マクロファージでは、細胞内の還元型グルタチオンが酸化型マクロファージより相対的に多いのに対して、酸化型マクロファージでは、還元型グルタチオンが還元型より相対的に少ない。また、還元型マクロファージと酸化型マクロファージでは、還元型GSH含量の違いのために転写制御因子の活性化に違いが生じ、サイトカインや炎症伝達因子の遺伝子発現に違いが起こり、産生される炎症性サイトカインや炎症性メディエーターの種類や量が変化し、炎症の質が変化する。

【 0 0 4 1 】

酸化型マクロファージでは、IL-6、IL-1、IL-8、IL-10、TNF、過酸化水素、スーパーオキシド、PGE2、PDGF等の炎症性サイトカイン及びメディエーターが産生されるのに対して、還元型マクロファージでは、一酸化窒素(NO)、IL-12、IL-18、LTB4等が産生され組織傷害を引き起こす。更に、酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージは、刺激等により変換する。例えば、炎症や敗血症性ショックを誘導するLPS（リポポリサッカライド）、PMA（ホルボールエステル）や、IL-4、TGF β 等のサイトカインにより人為的に刺激することにより、還元型マクロファージは酸化型に変換され、逆に、IFN γ 、IL-2、抗腫瘍性多糖であるレンチナン（LNT）やリボ酸等の抗酸化剤を添加することにより、酸化型マクロファージを還元型に変換することができる。

【 0 0 4 2 】

本発明に従えば、マクロファージ及び単球細胞内の還元型グルタチオン含量を

、例えば上記方法で測定した後に、マクロファージ及び単球細胞内の還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質、特に低分子化合物で経口摂取でも活性が保持されるものを、好ましくは医薬品として通常の製剤化を行い、病態をモニターしつつ連日若しくは一定の期間を開けて患者に摂取させればよい。慢性期においては長期間の服用継続により効果が著明となる。

【 0 0 4 3 】

本発明においてマクロファージ、単球細胞或いは樹状細胞内の還元型グルタチオン含量を減少させる作用を有する物質として、好ましくはN,N'-ジアシルシスチン、同エステル体、BCNU、BSO、マレイン酸ジエステル等の低分子化合物の中から選択することができるが、これらに限定されることなく、試験管内でマクロファージと数時間（1～24時間程度）培養して細胞内の還元型グルタチオン含量を低下させる作用を有する化合物であればよく、このような化合物全て本発明に使用する前記有効成分の中に含まれる。これらの有効成分を本発明において使用する場合、1種のみ或いは複数（混合物）用いることができる。その効果は摂取若しくは投与後炎症局所や末梢血から単核球を採取し、前述の方法で細胞内還元型グルタチオン量（含量）の治療前に対する変化を検定することで判定することができる。このことで移植拒絶反応抑制剤としての有効性は明確に判定され、本発明の対象病態に対して効果を有する。

【 0 0 4 4 】

対象として用いることのできる病態としては、心臓、肺臓、腎臓、肝臓、皮膚移植やマイナー抗原の適合性が問題になる角膜移植更には角膜上皮、角膜幹細胞移植等Th1/Th2バランスがTh1に偏位しているために引き起こされる拒絶反応に伴伴する病態であれば広範に本発明を適用することができる。

【 0 0 4 5 】

本発明で取り扱う移植拒絶反応抑制剤は実際の医療現場では単独で投与することもできるが、本発明に含まれる経口摂取可能な移植拒絶反応抑制剤同士、若しくは、経口摂取不可能であるが異なる作用機転でマクロファージ、単球細胞、及び樹状細胞何れかの細胞内の還元型グルタチオン含量を低下させる他の物質、例えば、ステロイド性化合物や、IL-4、IL-10及びTGF- β を代表とするサイトカ

イン等生体外由来並びに生体内由来の物質と混合若しくは併用することもできる。これらサイトカインには其れ自体がマクロファージ、単球細胞、樹状細胞内の還元型グルタチオン含量を低下させることも本発明の過程で見出され、本発明の有効性とその範囲を補強するものである。また、本発明で取り扱う移植拒絶反応抑制剤は単独若しくは眼科領域で扱われる薬剤との併用で点滴剤として用いることも可能である。

【 0 0 4 6 】

細胞内の還元型グルタチオン量に差のある場合には、即ち還元型GSH含量の高いマクロファージ、単球及び樹状細胞（還元型マクロファージ）と還元型GSH含量の低いマクロファージ、単球及び樹状細胞（酸化型マクロファージ）が混在する場合、還元型GSH含量の高いマクロファージ、単球、或いは樹状細胞（還元型マクロファージ）を選択的に除去することも本発明に含まれる。その際に用いられる物質は低分子化合物、高分子化合物の何れでもよく、なかんずく抗体及びその誘導体は効率的である。

【 0 0 4 7 】

既に述べた通り、マクロファージ／単球（樹状細胞を含む。）の機能の多様性と細胞亜集団の対応については今まで全く不明であった。このため、移植拒絶反応における病態進展に、マクロファージ／単球／樹状細胞の抗原提示機能並びにアクセッソリー機能は極めて重要な役割を有しているにも拘らず、マクロファージ／単球細胞亜集団の存在を想定しての機能分類の移植拒絶反応抑制への応用は全くなされておらず、想定されたことすら無かった。本発明において、例えば臓器拒絶反応において重要な役割を果たしているマクロファージ、単球、樹状細胞中の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの含量を検定することにより、不均一なマクロファージ集団が2つのタイプ即ち酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類され、還元型マクロファージが細胞性免疫に関与するTh1偏位に関与すること、当該マクロファージの酸化還元状態が臓器移植拒絶反応の病態に重要な役割を果たしていることを見出した。この2種のマクロファージの存在割合を人為的に制御するには前述の低分子化合物を医薬品として用いる以外に、何れか片方のマクロファージを選択的に除去することも頗る有効な方法であ

る。片方のマクロファージにのみ若しくは多量に発現されているマーカーに対する抗体を用いればよいことは当該業者には容易に想定できるところである。

【 0 0 4 8 】

臓器移植モデル実験は広く行われているので本発明の実施態様の骨子を角膜移植、並びに皮膚移植について述べる。

【 0 0 4 9 】

同種異型角膜移植における角膜生着の誘導を判定するには、8～10週令のマウスを使用しレシピエントとしてBALB/c (H-2d)マウス、ドナーとしてマイナー抗原のみ異なるB10.D2 (H-2d) マウスを使用する。

【 0 0 5 0 】

高率に、そして早期に拒絶反応が生じ易いハイリスク眼である角膜新生血管をレシピエントに誘導するには11-0のナイロン糸を3糸、角膜実質に縫着し、14日間留置し、本ナイロン糸は角膜移植時に抜去する角膜移植は以下のように行う。レシピエントマウスに3mgのketamineと0.0075mgのxylazineを腹腔内に投与して麻酔し移植を行う。ドナーマウスの角膜中央部を円状に直径2mm切除し、移植片を作成する。ホストマウスの角膜中央部を直径2mm切除し、ドナー角膜を、11-0ナイロンを使用して8糸端々縫合する。術後は抗生剤の軟膏を塗布し、8-0ナイロンを使用して眼瞼縫合を行う。眼瞼縫合は術後72時間後に抜去し、角膜縫合は移植後7日に抜去する。

【 0 0 5 1 】

角膜拒絶反応の判定にはスリットランプ顕微鏡を用い、週に2回観察する。角膜混濁を6段階にスコア化することにより拒絶反応を判定する。判定可能時期は移植後14日以降で、スコア3以上、21日以降でスコア2以上を拒絶反応と判定する。(0:透明生着、1:軽度角膜表層混濁及び虹彩血管・虹彩紋理明瞭透見可、2:軽度角膜実質混濁及び虹彩血管・虹彩紋理透見可、3:中等度角膜実質混濁及び虹彩血管・虹彩紋理透見不可、4:高度角膜実質混濁及び虹彩縁透見不可、5:完全角膜混濁及び前房透見不可)。

【 0 0 5 2 】

薬剤(本発明に使用する有効成分)の投与方法については、例えば次の方法が

ら理解される。

【0053】

一回の投与法は、薬剤を生理食塩水に所定濃度に溶解若しくは懸濁させた後、0.5mlをマウス腹腔内に注入する。注入時期は角膜移植を行う7日前、4日前、及び1時間前の3回である。対照マウスには同時期にとして腹腔内に0.5mlの生理食塩水を注入する。角膜移植の生着率の有意差検定にはKaplan-Meier survival curves を用い、Breslow-Gehan-Wilcoxon testによって比較した。P値が0.05未満を有意とする。

【0054】

角膜上皮移植の意義は次の通りである。

角膜は5層からなり、外側から、角膜上皮、ボウマン膜、角膜実質、Descemet膜、角膜内皮である。角膜上皮は増殖能が高く、角膜輪部にあるstem cellから、細胞が供給されている。従って、角膜中央部の移植である全層角膜移植や表層角膜移植術を用いても角膜上皮は数ヶ月でホストの角膜上皮に置き換わる。また、この5層構造のうち、角膜上皮が最も抗原性が高く、移植後早期の拒絶反応のターゲットとなり易い。最後に、角膜上皮は炎症や拒絶反応によって非常に脱落し易い層で、ドナー上皮の維持は非常に難しい。現在、健常組織に置き換える、若しくは欠損した組織を補う意味で角膜移植術が用いられている。角膜移植を行う意義としては（1）混濁した角膜を透明にすることにより視力改善を図る、（主に角膜全層移植・角膜表層移植によって治療）（2）増殖しない角膜内皮細胞が、手術侵襲や疾患によって減少し、水疱性角膜症を生じた角膜に対し、内皮細胞を補う目的で視力改善や疼痛解除を図る。（主に角膜全層移植によって治療）（3）角膜上皮がstem cellを含めて障害を受けた角膜に対し、結膜上皮細胞の侵入を阻止し、透明な角膜上皮細胞で被覆させる等、がある。角膜上皮移植は主に（3）の目的で使用されるが、角膜混濁を伴う症例が多く、（1）の意味合いを持つことが多い。

【0055】

角膜上皮が欠損し、結膜上皮で覆われ、混濁を生じる眼表面疾患に対する外科的治療とし、角膜上皮移植術が行われている。角膜上皮移植術とは、ドナー角膜

から角膜輪部上皮と浅層実質のみを切除し、ホスト輪部に移植する方法であり、移植片の角膜上皮が恒常的に増殖を繰り返し、ホスト角膜上皮を維持することを目的としているものである。しかし、その中でも、スティーブンス-ジョンソン (Stevens-Johnson) 症候群や眼類天疱瘡、角膜腐食等、強い炎症を伴った難治性角結膜疾患においては、その予後は極めて不良である。その最大の理由として、強い抗原性を有する異系 (アロ) の角膜上皮が宿主の免疫系に認識され拒絶を受けることが挙げられる。また、移植部位が血管組織やランゲルハンス細胞の多い角膜輪部であるため、ドナー抗原に対する抗原感作や拒絶反応が生じ易いことが挙げられる。更に、拒絶反応の予防のため術後に多量の免疫抑制剤を全身、及び局所投与することによって生じる合併症もその予後不良の大きな要因となっている。ステロイドの副作用としては全身性に、易感染性、糖尿病、消化管潰瘍、神経症状、肥満があり、眼局所的にもステロイド緑内障、ステロイド白内障、易感染性などがある。従って、ドナー抗原に対する免疫反応のみを選択的に抑制させる本発明になる方法が理想と考えられる。このことは、現在積極的に治療を行われていない難治性角結膜疾患に対し、新しい安全な治療法を提供できることとなり、その社会的貢献度は極めて高いと考えられる。角膜上皮移植は以下のように実施する。ドナーマウスの眼球をバナス (Vanas) 剪刀を用いて角膜輪部で切除し、全層角膜片を作成する。更に、1.0mm X 2.5 mmの角膜片に分割する。分割したドナー角膜片は移植術まで、一時、RPMI培地 (medium) に保管する。ホストマウスを麻酔し、角膜上皮を角膜中央から角膜輪部まで丁寧に、強膜剪刀を用いて剥離する。角膜輪部・結膜移行部の強膜を約1.0~1.5mmの幅で半層切除する。強膜切除部位にドナー角膜片を3片、それぞれ11-0ナイロン2糸を用いて縫着する。尚、ホスト眼球は右眼のみを使用する。

【0056】

角膜幹細胞 (Stem cell) 移植について記す。Stevens-Johnson症候群や眼類天疱瘡、角膜腐食等の疾患ではStem cellを含めた角膜上皮が脱落し、血管を伴った不透明な結膜上皮の侵入を来す。また、膠様滴状角膜変性症等は角膜上皮に遺伝的に異常がある疾患ではStem cell自体に異常がある。これらを治療する方法としては正常眼の輪部にある健全な角膜上皮Stem cellを移植し、正常角膜細

胞を常に供給させる以外に方法が無い。しかし、異系角膜上皮移植は拒絶され易く、維持が難しい。従って、本発明の移植拒絶反応抑制剤を用いて拒絶反応を抑制することがこれらの疾患の治療に転機を生むと期待される。

【 0 0 5 7 】

本発明の効果を確認するために構成する皮膚移植のモデル系は以下の通りであり、その著しい効果が容易に理解される。

【 0 0 5 8 】

8～10週令のマウスを使用し移植のレシピエントとしてBALB/c (H-2d)マウス、ドナーとしてマイナー抗原のみ異なるB10.D2 (H-2d) マウスを使用する。マウスを3mgのketamineと0.0075mgのxylazineを腹腔内に投与して麻酔し移植を行う。ドナーマウスの体幹(body wall)の皮膚を (8 x 8 mm) 胸部背面(thoracic wall)に移植する。移植片より大きいガーゼをかぶせ、抗生剤の軟膏を塗布する。ギブス包帯で固定して術式を終了する。ギブス包帯は7日後に除去し、その後は拒絶反応を毎日観察する。

【 0 0 5 9 】

本発明に含まれる臓器移植拒絶反応抑制剤は汎く広範な移植に適用できることは、マクロファージからの炎症性伝達因子の分泌を基本的なところで制御する点より明白である。例えば、非ステロイド性酸性抗炎症剤（アスピリン等）は、プロスタグランジン産生、遊離を抑制することでその薬効を発揮すると言われる。一方、ビタミンE等の抗酸化剤は活性酸素の産生を抑制することで薬効を発揮する等、その作用がマクロファージの多彩な機能の一局面を制御するのみである。そのためその効果も著明ではなく、特に慢性拒絶反応には効果は殆ど認められない。其れに対して、本発明に含まれる臓器移植拒絶反応抑制剤はマクロファージの酸化／還元状態を制御することを基本とするもので、一度に有害な炎症伝達因子の産生を多数抑制できるものである。従来の薬物の概念を基本から変革するものと言うことができる。

【 0 0 6 0 】

以上のように本発明の移植拒絶反応抑制剤、好ましくは本発明に含まれる臓器移植拒絶反応抑制剤の医療現場における有用な効能は、その斬新な作用機序から

して自明であり、疾拒絶反応の急性期、慢性期の何れにも有効である。中でも肺臓、心臓、腎臓、肝臓、皮膚、角膜等のTh1偏位による拒絶反応が主流の臓器移植に関わる病態であれば本発明の移植拒絶反応抑制剤を広範に適用することができる。

【0061】

以上、本発明の移植拒絶反応抑制剤を、例えば臓器移植に際して医薬品として使用したときに極めて有効で、優れているかを説明した。本発明の移植拒絶反応抑制剤は経口摂取可能な物質を有効成分として含有するため、その用途は、医療現場における医薬品（内服薬、輸液、点滴薬等）に限られない。即ち、ヒトマクロファージ及び単球細胞内の還元型グルタチオン量（含量）を減少させる作用を有する物質を単独若しくはその複数混合物として含有し、移植拒絶反応抑制作用を有する栄養剤や飲食品を、例えば医療用食品、健康食品、特定保健食品の形態で提供することも可能であり、これらも本発明に含まれる。

【0062】

製品の形態としては、液体成分に含有させることも、固形の食品の形をとることも可能である。

対象病態としては医薬品として提供する場合と同じである。

【0063】

次に、医薬品として使用する場合の製剤化について若干説明する。

本発明で使用する有効成分（1種又は複数）に加えて、薬理学的に許容し得る各種の製剤用物質（補助剤等として）を含むことができる。製剤用物質は製剤の剤型により適宜選択することができるが、例えば、賦形剤、希釈剤、添加剤、崩壊剤、結合剤、被覆剤、潤滑剤、滑走剤、滑沢剤、風味剤、甘味剤、可溶化剤等を挙げることができる。更に、製剤用物質を具体的に例示すると、炭酸マグネシウム、二酸化チタン、ラクトース、マンニトール及びその他の糖類、タルク、牛乳蛋白、ゼラチン、澱粉、セルロース及びその誘導体、動物及び植物油、ポリエチレングリコール、及び溶剤、例えば滅菌水及び一価又は多価アルコール、例えばグリセロールを挙げることができる。

【0064】

本発明の移植拒絶反応抑制剤は、公知の又は将来開発される様々な医薬製剤の形態、例えば、経口投与（内服薬）や、腹腔内投与、経皮的投与、吸入投与、目薬の形態等各種の投与形態に調製することができる。本発明の移植拒絶反応抑制剤をこれら様々な医薬製剤の形態に調製するためには公知の又は将来開発される方法を適宜採用することができる。

【 0 0 6 5 】

これら様々な医薬製剤の形態として、例えば適当な固形又は液状の製剤形態、例えば顆粒、粉剤、被覆錠剤、錠剤、（マイクロ）カプセル、坐剤、シロップ、ジュース、懸濁液、乳濁液、滴下剤、注射用溶液、活性物質の放出を延長する製剤等を挙げることができる。

【 0 0 6 6 】

以上に例示した製剤形態にある本発明の移植拒絶反応抑制剤には、薬効を奏するに有効な量の前記有効成分を含有すべきことは当然のことである。

【 0 0 6 7 】

本発明の移植拒絶反応抑制剤の投与量については、使用する有効成分の種類、拒絶反応の種類、そのの症状の程度、製剤の形態、副作用の有無やその程度等に応じて適当に選択される。例えば、N,N'-ジアセチルシスチンジメチルエステルを有効成分とする製剤の場合には、経口投与で患者 1 日当たり、当該有効成分の正味重量で表して好ましくは 1 m g ~ 1 0 g 程度、より好ましくは 3 m g ~ 1 g 程度、更に好ましくは 9 ~ 2 7 0 m g 程度投与することができる。また、重篤な場合には更に増量することもできる。投与の回数、時期については、数日に 1 回でも、また 1 日 1 回でも可能であるが、通常は 1 日当たり数回、例えば 2 ~ 4 回に分けて、投与される。また、静脈投与の場合には上記経口投与に比べて十〜二十分の一程度の投与量でもよい。

【 0 0 6 8 】

それ以外の成分を使用する場合でも、これらに基づき或いは知られている製剤技術を利用して、また各種の剤型に応じて必要な製剤を調製することができる。

【 0 0 6 9 】

本発明の移植拒絶反応抑制剤を飲食品、栄養剤に含めて使用する場合の使用量

については、前記医薬品に使用する場合に説明した 1 日当たりの経口投与量が参考になる。製品（医薬品、飲食品、栄養剤）中に占める有効成分の含量については、任意に選択することができるが、好ましくは 0.1～50 重量%程度、より好ましくは 0.2～40 重量%程度、更に好ましくは 1～5 重量%程度のものを使用することができる。

【0070】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

【0071】

（実施例 1）酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの機能の検定

【0072】

（方法）

酸化型マクロファージは LPS（リポポリサッカライド） $20\mu\text{g}$ をマウス腹腔内に投与して誘導されること、還元型マクロファージは LNT $100\mu\text{g}$ を同じく腹腔内に 1 日おきに 3 回投与することにより誘導されていることが、腹腔浸出細胞をプラスチック表面に付着させた後、モノクロロバイメイン $10\mu\text{M}$ と 37°C 、30 分間反応させ、ACAS で解析することで判明した。酸化型の増量は反応産物が殆ど認められないこと、即ちネズミ色や青色の画像になること、還元型の増量は赤色や黄色の画像が得られることから肉眼的に容易に検定できる。

【0073】

そこで、腹腔浸出付着細胞を以下のようにして酸化型及び還元型に誘導して産生される NO、IL-6 及び PGE2 を測定した。

【0074】

（1）材料

細胞：上記のように刺激して得られた腹腔浸出付着細胞、即ちマクロファージを 96 穴マイクロプレートに 1×10^5 細胞 / $200\mu\text{l}$ 宛添加

培地：フェノールレッドフリーの RPMI1640 $200\mu\text{l}$ / 穴

LPS：リポポリサッカライド（シグマ社製）（由来：E.coli） 100ng /

m l

IFN γ : 1 0 0 単位 / m l

【 0 0 7 5 】

(2) 培養方法

5% CO₂ インキュベーター中 37℃ で、4 8 時間培養。

【 0 0 7 6 】

(3) 測定方法

上記培養終了後、培養上清を回収し、IL-6 は IL-6 依存性の細胞株の MH 6 0 を用いて増殖反応で、PGE 2 はエライザキットを用いて、NO はグリースロイミン試薬を用いて、何れも当該業者が日常に行う方法で各々の産生量を測定した。

【 0 0 7 7 】

(結果)

酸化型マクロファージと還元型マクロファージとでは、産生する炎症性サイトカイン IL-6、炎症性メディエーター PGE 2、NO の産生強度及び種類が異なることが明らかである。即ち、酸化型マクロファージでは Th2 サイトカインである IL-6 の産生と免疫抑制性で Th1 誘導を抑制する PGE 2 産生が上昇し、組織傷害に働く NO 産生は低下する。これと対照的に還元型マクロファージからは NO の産生が上昇し、PGE 2 産生や IL-6 産生は抑制される。両マクロファージの間に機能的な差異の存在することが明確である。

【 0 0 7 8 】

(実施例 2) 遺伝子をノックアウトして免疫不全状態にした病態動物を用いての検定

【 0 0 7 9 】

酸化型 M ϕ と還元型 M ϕ において、何故炎症メディエーターやサイトカインの産生に違いが生じるのかを物質レベルで解析することは、拒絶反応のメカニズムを解明するために重要である。一般に、外からの刺激 (リガンド等) は、細胞表面上に存在する受容体 (レセプター) を介して細胞内に伝達する。レセプターからの信号により、種々のキナーゼが活性化され、更に転写因子が活性化され、転写因子が核内に移行し、標的となる遺伝子に結合して新形質が発現する。最近の

研究により、細胞内の酸化還元系は、転写因子の活性化、核内への移行、遺伝子との結合に関与していることが明らかとなりつつある (ANNUAL REV. IMMUNOLOGY, VOL.8, PP453-475,1990, EMBO J.,10,2247-2251(1991)参照。)。M ϕ におけるレセプターを介した遺伝子発現系に、細胞内の酸化還元系がどのように関与しているかは現在のところ明らかではない。明らかにする一つ的手段として、レセプターからの信号伝達系に関与する分子を欠損しているノックアウトマウスよりM ϕ を調製し、酸化還元系の機能を解析した。具体的には、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、及びIL-15のレセプター構成分子として共通に用いられているコモンガンマ (common γ 鎖) (γ c)、及びその下流に存在し、 γ cからの信号を伝達する分子であるJ a k 3を標的分子とした。

【0080】

(サイトカイン、刺激剤)

マウスIFN γ は、ゲンザイム社製のリコンビナント体を用いた。ヒトIL-2、及びヒトIL-6は、味の素(株)の作成したリコンビナント体を用いた。ヒトIL-12は、ファーマンジェン社製のリコンビナント体を用いた。

【0081】

LPSは、ディフコ社製のE.Coli.055:B5由来のものを用いた。LNTは、味の素(株)で製造した製剤品を用いた。

【0082】

(使用したマウス)

γ cノックアウトマウスは、東北大医学部・菅村教授より、J a k 3ノックアウトマウスは、千葉大医学部・斉藤教授よりそれぞれ導入したものを用いた。

交配、及び対照として用いた野生型マウスは、C R J社より購入したC 5 7 B L/6を用いた。

【0083】

(腹腔M ϕ の採取)

腹腔細胞の採取は、エーテルにより犠牲死させたマウスの腹腔内に、氷冷した5mlのフェノールレッドフリーのDMEM培地(日研生物社製)を22ゲージの針を着けた注射筒により注入し、しごいた後、培地を抜き取ることにより行っ

た。

【 0 0 8 4 】

(IL-6の定量)

1 X 1 0⁶個のM ϕ に刺激剤を添加し、37℃のCO₂インキュベーターにて2日間培養した。遠心後培養上清を採取した。

【 0 0 8 5 】

IL-6の定量は、IL-6に依存的に増殖するマウスハイブリドーマMH60細胞を用いて行った(J.EUR.IMMUNOL.,VOL. 18, PP 951, 1988参照。)。10%FCS含有RPMI培地で1 X 1 0⁵個/mlに調製したMH60細胞液100 μ lに、培養上清100 μ lを添加し、37℃のCO₂インキュベーターにて、2日間培養した。その後、同培地にて5mg/mlの濃度に調製したMTT(シグマ社製)を10 μ l加え、37℃にて5時間反応させた。反応終了後遠心し、上清を160 μ l取り除き、塩酸-プロパノールを100 μ l加えて、ピペットマンで懸濁することにより細胞を溶解した。溶解後直ちに570nmの吸光度をイムノメーター(バイオラッド社製)により測定した。

【 0 0 8 6 】

(NO₂⁻濃度の測定)

1 X 1 0⁶個のM ϕ に刺激剤を添加し、37℃のCO₂インキュベーターにて2日間培養した。遠心後培養上清を採取した。

【 0 0 8 7 】

100 μ lの培養上清に、50mg/mlの濃度に蒸留水で調製したグリースロイミン試薬(和光純薬社製)を100 μ l加えて室温で15分間反応させた。反応終了後、540nmの吸光度を測定した。尚、スタンダードとして、NaNO₂を用いた。

【 0 0 8 8 】

(ACASによる細胞内GSHの検出)

Chambered coverglass(Nunc社製、#136439)に、RPMI1640培地(フェノールレッドフリー)にて調製した3 X 1 0⁵個/mlの細胞懸濁液を300 μ l入れ、37℃のCO₂インキュベーターにて2日間培養した。同培地にて洗浄

後、同培地にて調製した $10 \mu\text{M}$ の monochlorobimane (Molecular plobe社製) を $300 \mu\text{l}$ 添加し、 37°C の CO_2 インキュベーターに入れ、30分反応させた後、ACASにて蛍光強度を測定した。尚、ACASではUVレーザーを用いた。

【0089】

(IL-12の定量)

IL-12定量は、ヒトT細胞株2D6細胞を用いたバイオアッセイで行った (J.L. EUKOCYTE BIOLOGY, VOL 61, PP346, 1997参照。)。

【0090】

500 pg/ml のリコンビナントヒトIL-12、 $50 \mu\text{M}$ の2-メルカプトエタノール、及び10% FCS (牛胎児血清) を含むRPMI 1640培地にて培養しておいた2D6細胞をチューブに移し、IL-12を除いた同培地にて3回遠心洗浄し、細胞濃度を $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調製した。予め、 $50 \mu\text{M}$ の2-メルカプトエタノール、10% FCSを含むRPMI 1640培地により系列希釈したサンプルを $100 \mu\text{l}$ ずつ入れた96穴平底プレートに、細胞懸濁液を $100 \mu\text{l}$ ずつ加えた。その後、 37°C 、5% CO_2 インキュベーターに入れ、48時間培養した。最後の6時間で、 ^3H -TdRをパルスした ($50 \mu\text{M}$ の2-メルカプトエタノール、10% FCSを含むRPMI 1640培地により、 370 kBq/ml に調製したものを $50 \mu\text{l}$ ずつ添加)。細胞をハーベストし、 β カウンター (マトリックス96; パカード社製) で放射活性を測定した。

【0091】

(ノックアウトマウスより調製したM ϕ のGSH濃度の測定)

それぞれのノックアウトマウスの腹腔細胞を調製し、MCB試薬を用いたACASにより、細胞内GSH量を解析した。対照のマウス (C57BL/6) に比べ、何れのマウスにおいても、還元型グルタチオンの含量は著明に減少した。

【0092】

(ノックアウトマウスより調製したM ϕ の機能)

野生型マウス (C57BL/6)、それぞれのノックアウトマウスより腹腔細胞を調製し、LPS、IL-2、IFN γ 、及びその組み合わせにより刺激し、NO産生、

IL-6産生、及びIL-12産生能を測定した。NO産生に関しては、無刺激では何れのマウスでも殆ど産生が観られれないが、LPSとIFN γ 刺激組み合わせにおいて、 γ cノックアウトマウスでは、IL-2の併用添加効果が殆ど観られず、対照マウスに比較してNO産生は半分以下に低下した。J a k 3 ノックアウトマウスについても γ cと同様の結果であった。次に、IL-6の産生能について解析した。LPS刺激では、 γ cノックアウトマウスで亢進がみられ（対照81 pg/mlに対し962 pg/ml）、IFN γ 刺激では、 γ cノックアウトマウスで亢進が観られた。この結果は、NO産生の抑制パターンと同様であった。次に、LPS、及びIFN γ 刺激によるIL-12産生能を検討した。しかし、何れのマウスにおいても産生は全く観られなかった。このことは、此処に用いた遺伝子ノックアウトマウス病態動物は酸化型マクロファージが増量しTh2主流の液性免疫が亢進し、Th1によって担われる細胞性免疫が低下していることを示す。病態動物モデルにおいても本発明が免疫系疾患の病態診断に独創的で、有意義であることを明確に示す例である。

【 0 0 9 3 】

（実施例3）酸化型マクロファージ誘導による、角膜移植片生着誘導

8～10週令のマウスを使用し、移植のホレシピエントとしてBALB/c (H-2d)マウス、ドナーとしてマイナー抗原のみ異なるB10.D2 (H-2d) マウスを使用した。

【 0 0 9 4 】

高率に、そして早期に拒絶反応が生じ易いハイリスク眼である角膜新生血管をレシピエントに誘導する。角膜新生血管の誘導には11-0のナイロン糸を3糸、角膜実質に縫着し、14日間留置し、本ナイロン糸は角膜移植時に抜去する。マウスに3mgのケタミン (ketamine) と0.0075mgのザイラジン (xylazine) を腹腔内に投与して麻酔し移植を行った。ドナーマウスの角膜中央部を円状に直径2mm切除し、移植片を作成し、レシピエントマウスの角膜中央部を直径2mm切除し、ドナー角膜を11-0ナイロンを使用して8糸端々縫合した。術後は抗生剤の軟膏を塗布し、8-0ナイロンを使用して眼瞼縫合を行う。眼瞼縫合は術後72時間後に抜去し、角膜縫合は移植後7日に抜去した。角膜拒絶反応の判定にはスリットランプ顕微鏡を用い、週に2回観察した。角膜混濁を6段階にスコア化することにより拒絶反応を判定する。判定可能時期は移植後14日以降で、スコア3以上、21日以降で

スコア 2 以上を拒絶反応と判定している。

【 0 0 9 5 】

(0 : 透明生着、1 : 軽度角膜表層混濁及び虹彩血管・虹彩紋理明瞭透見可、2 : 軽度角膜実質混濁及び虹彩血管・虹彩紋理透見可、3 : 中等度角膜実質混濁及び虹彩血管・虹彩紋理透見不可、4 : 高度角膜実質混濁及び虹彩縁透見不可、5 : 完全角膜混濁及び前房透見不可)。

【 0 0 9 6 】

薬剤N,N'-ジアセチルシスチンジメチルエステルは、一回当たり400 μ g/ml溶液を0.5ml宛腹腔内に注入した。注入は角膜移植を行う7日前、4日前、及び1時間前の3回実施した。コントロールとして腹腔内にPBSを注入した。角膜移植の生着率の有意差検定にはカプラン-マイヤー生存曲線 (Kaplan-Meier survival curves) を用い、Breslow-Gehan-Wilcoxon testによって比較した。P値が0.05未満を有意とした。NAC(OMe)₂ 投与群(N=15)はPBS投与コントロール群(N=10)に比べ、有意に生着率が上昇した(P<0.0001)。ハイリスク眼においては移植片がおおよそ3週間で100%拒絶されるのに対し、3週の時点では拒絶反応は0%であり、レシピエントの角膜は炎症から落ち着き、透明性を取り戻し、更に、最終的に77%が生着した。

【 0 0 9 7 】

実施プロトコルのタイムテーブルは以下の通りである。

- day 14: 新生血管誘導のためのナイロン糸角膜実質縫着；
- day 7: 薬剤腹腔内投与 (400 μ g/ml を0.5ml)；
- day 4: 薬剤腹腔内投与 (400 μ g/ml を0.5ml)；
- day 0: 薬剤腹腔内投与腹腔内投与 (400 μ g/ml を0.5ml)及び、角膜移植；
- day 3: 眼瞼縫合糸抜去 (開瞼)；及び
- day 7: 角膜縫合糸抜去。

拒絶反応を2回/週で観察 (8週まで) した。

【 0 0 9 8 】

(実施例4) 皮膚移植拒絶反応抑制

8~10週令のマウスを使用した。移植のレシピエントとしてBALB/c (H-2d)マウ

ス、ドナーとしてマイナー抗原のみ異なるB10.D2 (H-2d) マウスを使用した。レシピエントマウスに3mgのketamineと0.0075mgのxylazineを腹腔内に投与して麻酔し移植を行った。ドナーマウスの体幹(body wall)の皮膚を(8 x 8 mm) 胸部背面(thoracic wall)に移植し、移植片より大きいガーゼをかぶせ、抗生剤の軟膏を塗布する。ギブス包帯で固定して術式を終了する。ギブス包帯は7日後に除去し、その後は拒絶反応を毎日観察した。

【 0 0 9 9 】

薬剤N,N' ジアセチルシスチンジエチルエステルは、一回当たり400 μ g/ml溶液を0.5ml宛B10.D2ドナーとBALB/cレシピエントの双方共に、腹腔内及び、皮膚移植予定部位の皮下へ注入した。注入は皮膚移植を行う7日前、4日前、及び1時間前の3回実施した。コントロールとして腹腔内にPBSを注入した。皮膚移植後はBALB/cレシピエントの腹腔内、及び移植片の皮下にそれぞれ一回当たり400 μ g/ml溶液を0.5ml宛注入した。注入時期は、皮膚移植後3、7、10、14、17及び21日後である。コントロールとしてPBSを使用した。皮膚移植の生着率の有意差検定にはKaplan-Meier survival curves を用い、ブレスロー・ゲーハン・ウイルコクソン試験 (Breslow-Gehan-Wilcoxon test) によって比較した。P値が0.05未満を有意とした。

【 0 1 0 0 】

薬剤投与群(N=8, MST=28.3 \pm 1.8日)はPBS投与コントロール群(N=10, MST=14.14 \pm 0.47日)に比べ、有意に生着率が上昇した(P<0.013)。

【 0 1 0 1 】

(実施例5) 還元型マクファージからのTh1誘導性サイトカインIL-12の産生

レセプターからの信号伝達系に関与する分子を欠損しているノックアウトマウスよりM ϕ を調製し、酸化還元系の機能を解析した。具体的には、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、及びIL-15のレセプター構成分子として共通に用いられているcommon γ 鎖 (γ c)、及びその下流に存在し、 γ cからの信号を伝達する分子であるJAK3を標的分子とした。実施例2同様の方法で実施した。JAK3ノックアウトマウスを3群に分類し対照群としては通常の水道水の自由摂取群、NAC群としては1mg/mlのNACを溶解した水道水の自由摂取群、GSH-OEt群として

は 1 m g / m l の GSH-OEt を溶解した水道水の自由摂取群とし、S P F 条件下での飼育を 2 4 日間継続し、そこで腹腔浸出付着細胞即ちマクロファージを同様に得た。

【 0 1 0 2 】

(サイトカイン、刺激剤)

マウス IFN γ は、ゲンザイム社製のリコンビナント体を用いた。ヒト IL-2、及びヒト IL-6 は、味の素 (株) の作成したリコンビナント体を用いた。ヒト IL-12 は、ファーマンジェン社製のリコンビナント体を用いた。

【 0 1 0 3 】

LPS は、ディフコ社製の E. Coli. 055:B5 由来のものを用いた。LNT は、味の素 (株) で製造した製剤品を用いた。

【 0 1 0 4 】

(IL-6 の定量)

(NO₂⁻濃度の測定)

(A C A S による細胞内 GSH の検出)

(IL-12 の定量)

これらは全て実施例 2 に準じて実施した。

【 0 1 0 5 】

(ノックアウトマウスより調製した M ϕ の GSH 濃度の測定)

それぞれの処置を受けたノックアウトマウスの腹腔細胞を調製し、M C B 試薬を用いた A C A S により、細胞内 GSH 量を解析した。対照のマウス (水道水自由飲水群) に比べ、N A C 及び GSH-OEt 溶解水道水自由飲水群の何れのマウスにおいても、還元型グルタチオンの含量は著明に増加し、正常マウスに N A C 腹腔内投与で誘導される還元型 M ϕ の画像を示した。

【 0 1 0 6 】

(ノックアウトマウス処置の各群より調製した M ϕ の機能)

3 群、それぞれのノックアウトマウスより腹腔細胞を調製し、LPS、IL-2、IFN γ 、及びその組み合わせにより刺激し、NO 産生、IL-6 産生、及び IL-12 産生能を測定した。NO 産生に関しては、無刺激では何れのマウスでも殆ど産生が観ら

れない。次に、IL-6の産生能について解析した。LPS刺激では、ノックアウトマウスで962 pg/ml、NAC群で122 pg/ml、GSH-OEt群で82 pg/mlとなり、還元型に変換できることが機能面からも確認された。IL-6がTh2を誘導する主たるサイトカインであることを考慮すると、これらの物質の経口摂取で生体のTh1/Th2バランスの制御できることを明確に示す。この結果は、NO産生の抑制と薬物による回復パターンと逆相関した。次に、LPS、及びIFN γ 刺激によるIL-12産生能を検討した。対照群においては産生は全く観られなかった。このことは、ここに用いたJAK3遺伝子ノックアウトマウス病態動物は酸化型マクロファージが増量しTh2主流の液性免疫やアレルギー反応が亢進し、Th1によって担われる細胞性免疫が低下していることを示す。一方、NAC、GSH-OEt投与群では各々、420 pg/ml及び610 pg/mlのIL-12産生が認められた。病態動物モデルにおいても本発明が病態改善に独創的で、有意義であることを明確に示す例である。

【0107】

（実施例6）還元型、酸化型マクロファージからのIL-12産生の差異

T細胞の分化過程、選択過程、及び機能発現過程に異常があると、生体の免疫系が破綻することから、免疫系の中心的役割は、T細胞により担われていると考えられる。T細胞の亜集団の一つであるヘルパーT細胞（Th）は、リンホカインを産生することにより、免疫担当細胞や炎症性細胞を制御している細胞であるが、最近、Thは、産生するリンホカインの種類により、更にTh1とTh2の2種類に分けられ、それぞれが異なった免疫機能を担っているとの考えが提唱されている（J. IMMUNOL., VOL. 136, PP 2348, 1986参照。）。即ち、Th1は、IL-2やIFN γ を産生し、細胞性免疫の調節の主体であり、Th2はIL-4、IL-5、IL-6やIL-10を産生し、液性免疫の調節の主体であり、生体内の免疫調節の恒常性は、Th1とTh2のバランスにより保たれているとする考えである。通常は、Th1/Th2バランスがどちらかに傾くと、それを是正することにより恒常性が維持されるが、何らかの原因によりバランスが是正されない状態が持続すると免疫病が発症すると考えられている。Th1とTh2は、Th0という段階からそれぞれに分化するが、Th0からTh1への分化にはM ϕ の産生するIL-12が重要であり（IMMUNOLOGY TODAY, VOL.335,

PP 14, 1993参照。) 、Th0からTh2への分化にはN K T細胞が産生するIL-4が重要である (J. EXP. MEDICINE, VOL.179, PP 1285, 1994参照。) 。

【 0 1 0 8 】

前術の実施例でM ϕ のレドックス状態の相違によりM ϕ 機能が異なることが明らかである。M ϕ には、GSH量の相違から酸化型M ϕ と還元型M ϕ の2種類のM ϕ が存在し、NOやIL-6産生パターンが異なる。Th0からTh1への分化を誘導し、Th1/Th2バランス制御の鍵の分子であるIL-12の主な産生細胞はM ϕ と考えられる。本発明者等は、IL-12が還元型M ϕ からのみ産生することを見出した。本発明で得られた知見を基に、M ϕ のレドックス状態が、Th1/Th2バランスを制御していることを示し、本発明が移植拒絶反応の病態診断に如何に有用かを説明する。
(IL-12は還元型M ϕ から産生される)

【 0 1 0 9 】

LNTを腹腔内注射して調製したM ϕ は、GSH量の高い還元型であり、LPSを腹腔内注射して調製したM ϕ は、GSH量の低い酸化型である。LNT誘導M ϕ とLPS誘導M ϕ において、IL-12産生能が異なるか否かを検討した。LPSとIFN γ の刺激により、LNT誘導M ϕ では著明なIL-12産生 (1 3 1 2 p g / m l) が観られたが、LPS誘導M ϕ 、及び対照のレジデントM ϕ では産生が観られなかった。次に、細胞内GSH量を変化させる物質を腹腔内注射して調製したM ϕ を用いて同様の解析を行った。細胞内GSH量を増加させる物質であるGSH-OEt、低下させる物質であるBSO、DEMをそれぞれ投与し調製したM ϕ では、GSH-OEt投与マウス由来M ϕ でのみ、LPSとIFN γ 刺激によりIL-12が産生された (3 5 7 0 p g / m l) 。これらの結果は、細胞内のGSH量の多い還元型M ϕ でのみ、IL-12が産生されることを示す。

【 0 1 1 0 】

(還元型M ϕ からのIL-12産生は、細胞内GSH量を低下させることにより抑制される)

細胞内のGSH量の多い還元型M ϕ でのみ、IL-12が産生されることを示したが、この産生は、M ϕ を酸化型にすることにより抑制されるのか否かを検討した。即ち、LNT誘導M ϕ を、DEMや、BCNU刺激することにより、IL-12の産生が抑制さ

れるかを解析した。その結果、LNT誘導MφからのIL-12産生（828 pg/ml）は、DEM或いはBCNUを添加することにより、完全に抑制される（0 pg/ml）ことが明らかとなった。即ち、細胞内の還元型グルタチオンを枯渇させ、還元型Mφを酸化型Mφへと変換することにより、IL-12産生は抑制されることが示唆された。

【0111】

【発明の効果】

本発明により、ヒトの肝臓、心臓、肺臓、腎臓、皮膚、角膜、角膜内皮（角膜上皮細胞等）等、ヒトの臓器移植（その一部の移植を含む。）及び各組織の幹細胞移植における拒絶反応に随伴する病態の治療、改善、及び／又は予防に極めて有効な移植拒絶反応抑制剤を提供する。この結果、このような移植拒絶反応抑制剤を使用した医薬品（経口用製剤、輸液、点眼薬等を含む。）並びに移植拒絶反応抑制剤を含む食品、栄養剤等を提供することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ヒトの臓器移植拒絶反応に随伴する病態の改善、治療のため、マクロファージ、単球、樹状細胞の酸化、還元状態を酸化型に制御し、Th1/Th2バランスをTh2に偏位させ得る斬新な方法を提供することで、ヒトの肝臓、心臓、肺臓、腎臓、皮膚、角膜、角膜上皮等、ヒトの臓器移植及び各組織の幹細胞移植における拒絶反応に随伴する病態の治療、改善、及び／又は予防を目的とした移植、特に臓器移植拒絶反応抑制剤を開発し、それを使用して医薬品（輸液を含む。）並びに食品、栄養剤等を提供する。

【解決手段】

ヒトから分離、採取した体液／細胞試料を用いて、マクロファージ細胞内の酸化型及び／又は還元型グルタチオン含量を検定することにより、マクロファージをそれぞれ異なった機能を有する酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類し、その存在割合を、特定の低分子化合物で酸化型マクロファージに人為的に偏位させたり、還元型マクロファージを人為的に除去することで、ヒトの臓器移植拒絶反応の抑制治療に有効な医薬品（経口製剤、点眼薬、注射製剤、輸液等）として使用可能な移植拒絶反応抑制剤を提供する。

更に、当該移植拒絶反応抑制剤を使用し、拒絶反応抑制に役に立つ飲食品（健康食品等）、栄養剤等を提供することもできる。

【選択図】

なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 0 6 6]

1. 変更年月日	1 9 9 1 年 7 月 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号
氏 名	味の素株式会社